

## *Aspergillus niger*에서 추출되는 포도당 산화효소의 정제

박현규 · 황우성\* · 김인호†

충남대학교 화학공학과

\*RMC Korea

(2001년 4월 9일 접수, 2001년 6월 25일 채택)

## Purification Study of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*

Hyun-Kyu Park, Wu-Sung Whang\* and In-Ho Kim†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

\*RMC Korea, TIC/TBI Center in KAIST, Daejeon 305-701, Korea

(Received 9 April 2001; accepted 25 June 2001)

### 요 약

Glucose oxidase를 보다 간단한 방법으로 정제하는 방법을 찾기 위해 Table 1에 근거한 여러 가지 정제법을 도입하여 각 단계를 거칠 때마다 단백질의 농도와 GOD의 역가를 측정하였다. *Aspergillus niger*를 배양한 후 그 상등액을 원심분리하고 진처리 공정으로 증류수를 이용하여 투석을 시킴으로써 시료의 탁도를 떨어뜨리고 음이온 교환기인 DEAE-Sephacel에서 정제한다. 용리액 조성으로 0.1 M NaCl과 0.1 M McIlvane buffer(pH 6.0)를 이용하여 GOD를 분리한다. 이러한 정제 과정을 거치게 되면 높은 Sp. activity(304  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ )와 높은 순도(95%)의 glucose oxidase(GOD)를 얻을 수 있었다. 얻어진 GOD는 보고된 GOD의 분자량 150,000과는 달리 그 분자량이 70,000-81,000 사이로 확인되었다.

**Abstract** – Glucose oxidase(GOD) from *Aspergillus niger* was mainly purified by anion exchange chromatography on DEAE-sephacel. Other purification steps such as salting out, cation exchange chromatography, and dialysis were also tried. The purified enzyme was homogeneous on HPLC and SDS-PAGE. We determined an optimum purification condition for high GOD purity. Activity(304  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ ), concentration(5.07 mg/mL) and yield (95%) from the starting enzyme source were obtained.

**Key words:** Glucose Oxidase, *Aspergillus niger*, Purification, HPLC

### 1. 서 론

Glucose oxidase(GOD)는  $\beta$ -D-Glucose를 산화시켜서 glucono- $\delta$ -lactone으로 만들고, 이 반응에 사용되는 산소를 과산화수소로 환원시킨 GOD를 만들어내는 곰팡이는 여러 종이 있지만 주로 *Penicillium notatum*, *Penicillium anagasakiense* 그리고 *Aspergillus niger* 등에서 많은 양을 얻을 수 있다. 본 연구에서는 *Aspergillus niger*를 사용하였으며, 이 곰팡이에서 추출된 GOD는 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide)를 포함하고 있으며 그 분자량은 대략 150,000정도이다[1].

또한, gluconic acid를 만들어내는 GOD는 산소 선택성이 좋아 산소 제거, glucose 제거제, 특히 식품 저장시 과산화수소의 발생원으로서 이용하기도 한다. 또한, glucose의 농도를 분석하기 위한 생분해성분, 식품분야, 임상분야에서 바이오센서로서 고정화 효소로 사용되어지고 있다[2, 3].

이용가치가 많은 GOD를 분리정제하기 위한 연구는 이미 많이 이뤄져 있다[4, 5]. 이 효소의 최적 pH는 5.5, 등전점은 4.2정도라고 알려져

있다[1]. 이를 이용한 정제 공정으로 ammonium sulfate fractionation[1]과 DEAE-Cellulose[6]를 거론할 수 있는데 전자의 방법에서는 높은 수율을 얻을 수는 있지만 specific activity(U/mg protein)가 높지 못하며 후자의 경우는 specific activity가 조금 더 높게 나타날 뿐이다.

이미 연구된 정제 공정에 의하면 과정이 복잡하고 여러 단계로 수행함에 따라 GOD의 수율이 떨어진다. 따라서, 본 연구의 목적은 간단한 정제 방법으로 높은 수율의 GOD를 얻는데 있다. 이를 위해 사용된 이온교환기는 GOD의 용출에 있어서 끌림 현상이 양이온 교환기보다 적게 나타나는 음이온 교환기 DEAE-sephacel을 사용하였으며 사용한 완충용액은 오염물질을 보다 잘 제거할 수 있는 McIlvane buffer로 단백질 용출시켰다. 이온교환 크로마토그래피(IEC)로 정제된 GOD의 농도 결정과 specific activity의 측정으로 두 가지 모두를 최적으로 만족하는 고수율/고순도의 GOD를 얻을 수 있는 간단한 정제공정을 연구하였다.

### 2. 실험재료 및 방법

#### 2-1. 생산 균주의 배양

본 연구에 사용한 균주는 ATCC 9029 *Aspergillus niger*이며 500 mL

†E-mail: ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

Table 1. Explanation of various samples

Sample no.	Step				
	A	B	C	D	E
1,4	●				
2, 3, 5	●	●	●		●
6, 7, 8, 9	●				●
10	●			●	●
11	●	●	●	●	●

A-Centrifuge(12,000 rpm, 4 °C, 20 min)

B-Ammonium sulfate fractionation(70% and then 100%)

C-Dialysis with 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.0

D-Dialysis with DW

E-Ion exchange chromatography

용량의 baffie flask에서 복합/합성 배지[7-9] 100 mL을 shaking incubator에서 배양하였다.

## 2.2. 분리 및 정제

배양액의 상등액만을 분리 Table 1에 근거하여 CM-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B를 이용하여 정제를 수행하였다. GOD를 정제함에 있어서 중요한 것은 이온교환기의 선택, 용출 buffer의 종류와 pH, 용매의 단일성 여부 및 적절한 정제 시료 준비 단계를 결정하여 효소 정제에 필요한 조건을 찾는 데 있다.

GOD 단백질의 순도는 포함된 불순물 함량의 직접 측정과 GOD 활성 이외의 효소 활성으로써 cellulase와 catalase의 포함을 정량하는 것으로 전자는 전기영동으로, 후자는 catalase 활성도의 직접적 또는 간접적인 측정이 있다.

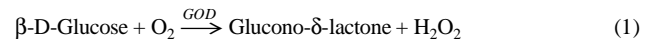
## 2.3. 단백질 농도 및 GOD 역가 측정

균체의 생육은 육안으로 관찰이 가능하며 그 배양액 중 단백질의 농도 및 GOD의 역가를 측정하였으며, 배양액이 정제 단계(Table 1)를 거칠 때마다 측정 후 최대의 수율을 얻을 수 있는 과정을 선택함에 있는데, 먼저 단백질의 농도는 표준 단백질 BSA(BioRad, 0.15 mg/mL)의 다양한 농도에 대해 Bradford 방법[10]으로 595 nm에서의 흡광도를 이용한 표준 검량선으로부터 GOD가 포함되어 있는 단백질의 농도를 결정할 수 있다. 또한 GOD는 270-280, 375-380, 450-460 nm[11]에서 최대 흡광도를 나타냄을 이용하여 GOD의 역가를 다음 반응식에서와 같이 ABTS(2,2'-azido-di-[3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid]) 용액의 색깔 변화를 420 nm[1, 12]에서 시간에 따른 변화량으로 측정하였다. 측정된 activity는 units(μmol/min)로 나타내는데 전체 단백질 중 GOD와 같은 효소의 정량은 농도 대신에 전체 단백질 mg당 units로 나타낼 수 있는데 그 계산은 식 (6)으로 계산될 수 있다.

GOD의 역가는 Table 2에 나타난 protocol(Total vol.=1.20 mL)을 근거로 측정하였다. GOD에 의한 glucose의 산화와 ABTS의 반응식, 역가를 측정하기 위한 계산식이 다음과 같다.

Table 2. Protocol for measurement of GOD activity

	Blank	GOD	Catalase	Final conc.
Glucose, 1.5 M	0.2	0.2	0.2	250 mM
ABTS, 20 mM	0.1	0.1	0.1	1.65 mM
Na-Azide	0.02	0.02	-	2.0 mM
Buffer, 0.2 M pH 5.8	0.8	0.79	0.81	132 mM
HRP, 40 U/mL	0.08	0.08	0.08	2.6 U/mL
Enzyme solution	-	0.01	0.01	Sample GOD



$$\text{ABTS mole absorptivity } \epsilon = 22.0 \Delta A_{420}/\text{mM} \quad (4)$$

$$\text{Activity}(\mu\text{mol/min}) = \frac{(\Delta A_{420}/\text{min})(\text{Cuvette Vol.})}{(\text{ABTS mole absorptivity})} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{Sp. Activity}(\mu\text{mol/mg} \cdot \text{min}) \\ = \frac{(\text{Activity})}{(\text{Protein conc.})(\text{Sample vol.})(\text{Dilution factor})} \end{aligned} \quad (6)$$

GOD의 주 반응은 식 (1)이다. 그러나 오염물질 중의 하나인 catalase에 의하여 부반응이 식 (2)와 같이 일어난다. 따라서 catalase의 제거가 중요하게 되는데 본 연구에서는 특별히 catalase만을 분리한 것이 아니라 GOD를 제외한 모든 단백질을 오염물질로 간주하였다. 위 반응식에서 식 (3)은 GOD에 의한 glucose의 산화 정도를 알아보기 위해, 즉 역가를 측정하기 위해 생성물인 과산화수소를 이용하였다. 과산화수소는 peroxidase에 의해 ABTS를 변색시키는데 그 변색 정도로 과산화수소의 양과 GOD의 역가를 측정하게 되는 것이다. 즉, GOD가 많이 존재하면 과산화수소도 많이 생성될 것이며, ABTS의 변색의 정도도 많을 것이기 때문이다. 따라서 420 nm에서의 흡광도의 시간에 따른 변화량을 측정하여 GOD의 역가를 식 (4)-(6)을 이용하여 계산할 수 있다. 역가를 측정하기 위한 또 다른 방법으로 o-dianisidine를 사용하기도 하는데 그 흡광계수가 약 7.5[13] 정도로 낮기 때문에 본 연구에서는 ABTS를 이용한 방법을 선택하였다.

## 2.4. SDS-PAGE와 HPLC

Table 1에 근거하여 얻어진 products에서 GOD의 분자량을 15% SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다. 또한, GOD는 4.6 mm I.D×250 mm L의 C<sub>18</sub> 컬럼에서 이동상을 90% water와 10% 아세토나이트릴 조성으로 용리를 시켰으며, 이때의 유속은 0.5 mL/min으로 흘려보냈다. 이는 Fig.

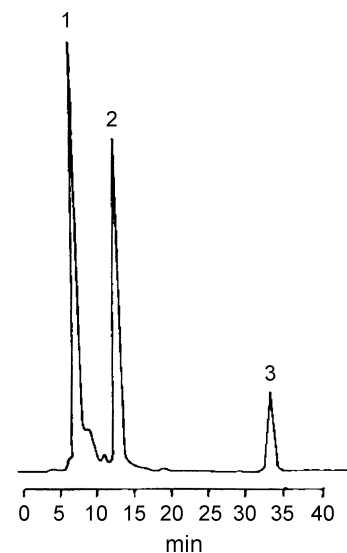


Fig. 1. The chromatogram of Flavin nucleosides on Hypersil 5 μ C<sub>18</sub>, 3.2 mm I.D×250 mm L column under conditions of 1.0 mL/min flow rate and 85% water/15% acetonitrile with 0.05% H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1. FAD(Flavin adeninedinucleotide), 2. FMN(Flavin mononucleotide), 3. Riboflavin.

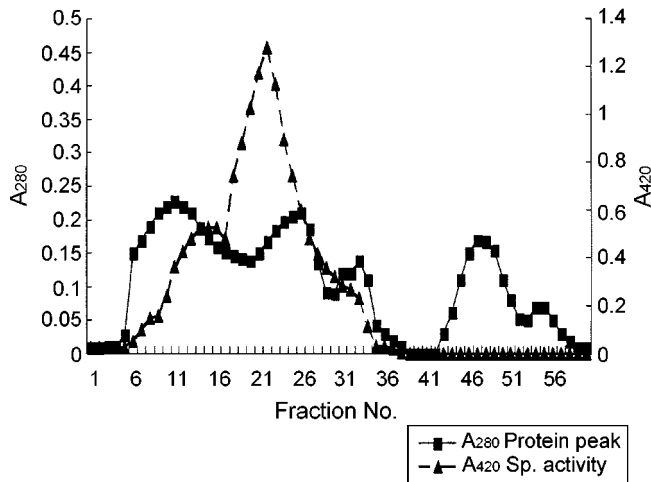


Fig. 2. Cation exchange chromatography; CM-Sepharose CL-6B, 22 mm LD×110 mm L, 0.1 M Citrate buffer pH 3.18.

1에서와 같이 GOD를 구성하고 있는 FAD의 용출 실험에 대한 기존의 크로마토그램을 근거로 실시하였다.

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 3-1. 이온교환기 및 Buffer의 영향

GOD의 pI=4.2로서 chromatography 정제에 필요한 용출 buffer를 선택하기 위한 기준으로 정지상은 통상적으로 양이온 교환기를 사용한다 (Fig. 2). 본 실험에서는 단백질의 탈착용액으로는 0.1 M NaCl과 용출 buffer를 사용하였다. Fig. 2에서는 2개의 큰 peak 군이 보이는데 수집된 단백질의 분석은 GOD의 최대 흡광도 영역과 비교해서 420 nm와 280 nm에서의 흡광도, 즉, GOD의 역가와 단백질의 농도 profile이 겹쳐지는 부분이 바로 GOD가 용출되는 부분임을 알 수 있다. A<sub>420</sub>의 peak와 겹치고 있는 fraction No. 6-36 부근에서의 용출 peak가 GOD를 포함하고 있는 단백질이고 역가를 보이지 않고 있는 fraction No. 41-56부근의 peak는 GOD가 없는 오염물질이라고 볼 수 있다. 따라서, Fig. 2에서 보여지듯이 GOD 활성 단백질의 용출이 초반에서 시작되고 있으며, 그 양이 90 mL 정도였다. 그러나 초반부에서 확실하게 두 peak가

겹치는 것이 없는 것으로 보아 양이온 교환기를 이용한 GOD 단백질의 분리는 끌림 현상 때문에 잘 이뤄지지 않는 것을 알 수 있다.

음이온 교환기에서 GOD 단백질의 분리능을 확인하기 위한 실험으로서 pH의 변화에 따른 단백질의 용출 경향을 알아보기 위하여 Fig. 3의 chromatogram에 적용된 조건으로 실험한 결과 역시 pH가 낮으면 이온 교환기에는 상관없이 단백질이 초반부에 과량 용출이 된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 양이온 교환기에서와 다른 점은 활성을 나타내는 peak와 단백질 농도의 peak가 겹쳐지는 부분, fraction No. 15-19 부분이 존재한다는 것이다. 즉, 양이온 교환기보다는 끌림 현상이 적어서 GOD 단백질의 분리에 유용하다는 것을 알 수 있다. 그러나 fraction No. 1-15 부분에 나타나 있는 peak와는 확실한 분리가 이뤄지지 않음을 알 수 있다. 따라서 사용되는 buffer 종류 및 pH, 농도의 변화에 따라 수행한 실험결과를 Fig. 4-6에서 보여주고 있다.

Fig. 4에서 볼 수 있듯이 Fig. 3과 같은 이온 교환기와 buffer의 농도이지만 pH를 pI보다 높게 하였을 때 A<sub>280</sub>과 A<sub>420</sub> chromatogram이 겹쳐지고 있는 fraction No. 19-26 부분이 GOD를 제외한 다른 단백질 보다 나중에 용출이 되었다. 그러나 fraction No. 15-19에서 중복되고 있음을 알 수 있다. 따라서 오염물질간의 분리를 위하여 오염물질을 보다 잘 제거

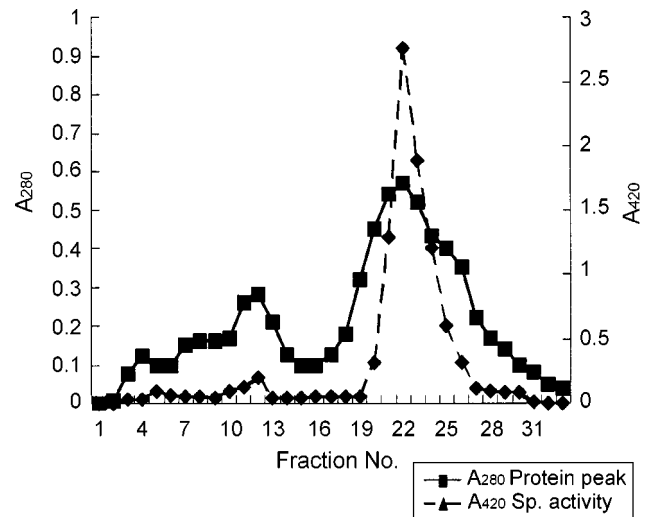


Fig. 4. Anion exchange chromatography; DEAE-Sepharose CL-6B, 22 mm LD×85 mm L, 0.1 M Citrate buffer pH 6.0.

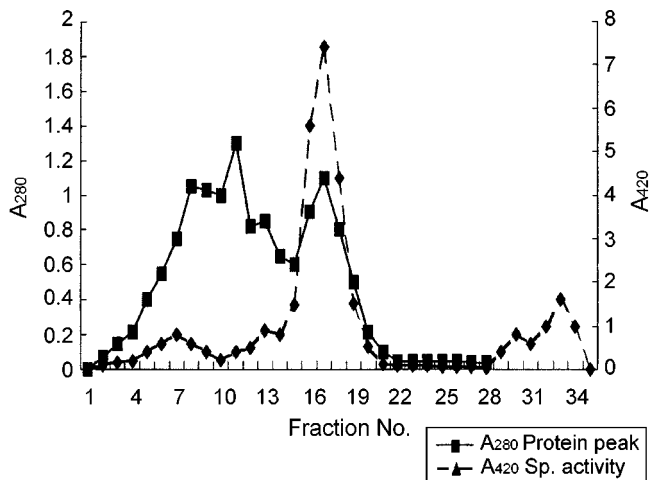


Fig. 3. Anion exchanger chromatography; DEAE-Sepharose CL-6B, 16 mm LD×90 mm L, 0.1 M Citrate buffer pH 3.4.

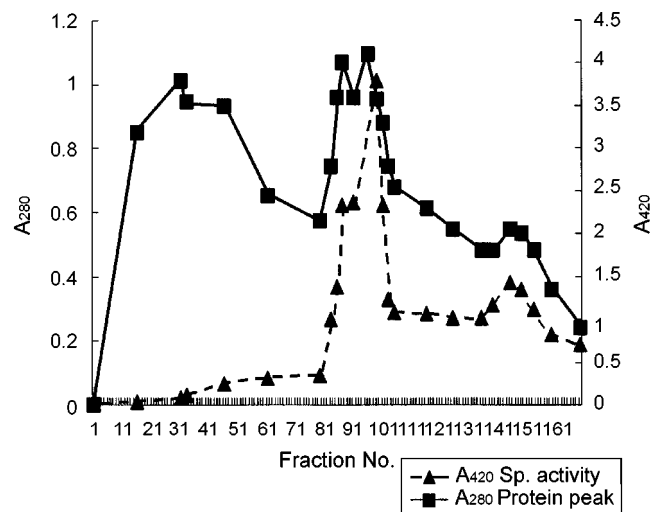


Fig. 5. Anion exchange chromatography; DEAE-Sepharose CL-6B, 50 mm LD×80 mm L, 0.05 M McIlvane buffer pH 6.0.

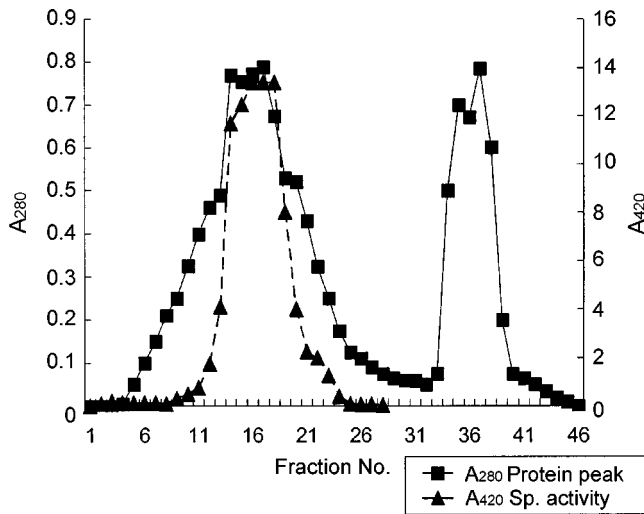


Fig. 6. Anion Exchanger Chromatography; DEAE-Sepharose CL-6B, 50 mm ID×80 mm L, 0.1 M McIlvane buffer pH 6.0.

할 수 있는 완충용액으로 알려진 McIlvane buffer[13, 14]를 사용하여 chromatography를 수행하였다(Fig. 5, 6). 그러나 McIlvane buffer의 농도가 Fig. 5에서와 같이 낮을 때는 단백질의 용출이 전체적으로 이뤄지고 있으며 GOD의 활성을 나타내고 있는  $A_{420}$  chromatogram은 2개의 peak로 구분되어짐으로서 낮은 농도의 McIlvane buffer는 GOD의 분리에 효과적이지 못하다는 것을 알 수가 있다. 따라서, 농도를 0.1 M로 증가시켰을 때 그 경향을 살펴본 Fig. 6에서 볼 수 있듯이 단백질이 초반에 용출이 이뤄지며 그 단백질에는 GOD가 포함되어 있음을  $A_{280}$ 과  $A_{420}$  chromatogram이 겹쳐진 결과로 확인할 수 있다. 그리고 효소의 활성이 나타나지 않는 두 번째 큰 피크는 buffer에 의해 오염물질이 제거되었다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험결과로 GOD를 fraction No. 11-24까지를 수집하였을 때 얻을 수 있었다.

GOD의 용출에 필요한 이온교환 크로마토그래피 조건은 초반부에 대부분의 GOD가 포함되어 있는 단백질이 용출되고, 나중에 오염물질이 제거되는 Fig. 6과 같은 결과가 얻어진 DEAE-Sepharose anion exchanger, 0.1 M McIlvane buffer, pH 6.0이 적절하다는 결과를 얻었다.

### 3-2. 단백질 농도 및 GOD 역가 측정

표준 단백질 BSA(BioRad, 0.15 mg/mL)를 이용하여 Table 1에 근거해서 얻어진 제품의 농도와 ABTS(2,2'-azido-di-[3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid])의 시간에 따른 변색정도를 이용하여 확인되는 역가가 Table 3에 나타나 있다.

Table 1에 나타난 것처럼 정제 단계를 거칠 때마다 단백질 농도와 GOD의 역가를 측정하였는데, 일반적으로 많이 사용되고 있는 단백질 정제 단계로서 황산암모늄 분획을 실시하였다. 1차로 70%까지 2차는 100%로 실시하였으며 그 과정 중에 얻어지는 침전물과 상등액에 포함된 단백질의 농도 및 GOD의 역가를 측정하였는데 상등액에 대부분의 단백질이 존재하고, 또한 활성을 가진 GOD가 포함되어 있음을 Table 3의 Sample No. 2, 3, 5, 11에서 확인하였다. 따라서, 황산암모늄 분획법은 GOD의 분리에는 적합하지 않음을 확인하였다.

이온교환크로마토그래피 적용에 용이하게 하기 위한 실험으로 증류

수나 10.0 mM sodium phosphate buffer pH 6.0, 투석액을 이용하여 cellulose MWCO 12,400(Sigma 9527) 투석막에서 실시한 시료 전처리 공정으로 시료의 탁도를 낮췄다. 시료의 부피가 증가하기 때문에 단백질의 농도는 낮아졌지만 역가는 원액과 거의 차이가 없음을 Table 1, 3에서 확인할 수 있다. 따라서, 투석은 GOD 정제 공정의 최종적인 이온교환 크로마토그래피를 수행하기 위한 전처리 공정으로 도입할 수 있었다.

Table 3에서 10번째 정제시료 즉, 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 20 min)를 이용하여 일차적으로 오염물질을 제거한 후 증류수를 이용한 전처리 공정을 거친 시료를 이온교환크로마토그래피를 수행함으로써 고농도, 고역가의 GOD를 얻을 수 있었다. Table 2에 근거하여 catalase의 역가를 테스트해 본 결과 catalase를 거의 포함하고 있지 않음을 알 수 있었다.

따라서, 종래 연구자들이 사용한 GOD의 황산암모늄 분획법은 부적절하였으며 최적의 GOD 분리정제 단계는 Table 1의 Sample No. 10과 같은 간단한 방법이었다.

### 3-3. Glucose Oxidase의 SDS-PAGE와 HPLC

Aspergillus niger를 배양한 후 얻어진 조효소액을 황산암모늄을 이용한 분별 침전, 0.01 M sodium phosphate buffer를 이용한 dialysis, DEAE-sepharose 칼럼 크로마토그래피를 행하여 GOD를 정제하였으며, 여기에 필요한 Sample 준비는 Table 1과 같으며 그 제품에 대한 전기영동 결과가 Fig. 7에 나타나 있다. GOD를 나타내는 위치에 띠가 크게 2가지 유형으로 나타남을 볼 수 있다. Lane 2, 3, 11에 나타난 띠는 약 70,000의 분자량을 가지는 GOD가 대부분을 차지하고 있고 Lane 5-10에서는 약 81,000의 GOD가 대부분이며 70,000정도의 GOD도 조금은 함유되어 있다. 이는 이전의 연구자도 보고한 바 있다[15].

Ye와 Combes는 GOD가 mono-, di-, tri-, tetramer로 존재하고, 그 중 di-, trimer에만 효소활성이 있다고 보고한 바 있다[16]. Pazur와 Kleppe[1]에 의해 언급되었던 GOD의 분자량 150,000은 최대로 형성 가능한 GOD를 의미하며, Table 1에 근거한 정제 방법은 GOD 분자에 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있지만, 본 연구에서는 GOD의 분자량 크기에 영

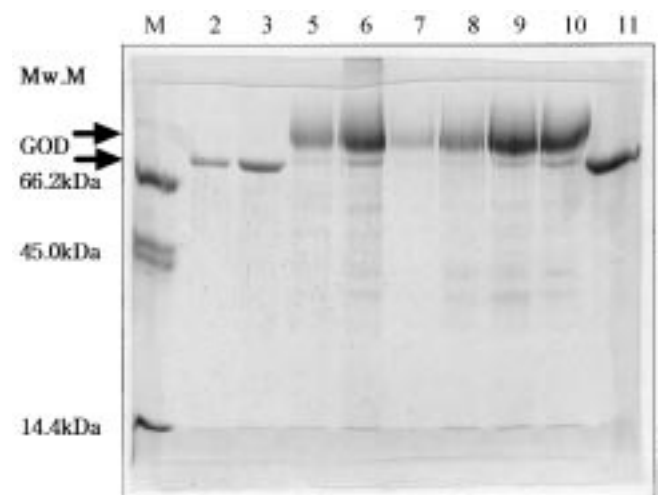


Fig. 7. 15% SDS-PAGE of various preparations.

Table 3. Determination of protein concentration and sp. activity of various samples in Table 1

Sample no.	2	3	5	6	7	8	9	10	11
Protein conc.(mg/mL)	1.45	2.01	3.12	5.69	1.66	5.28	5.31	5.06	2.01
Sp. activity(units/mg)	136	185	141	202	207	233	173	303	214

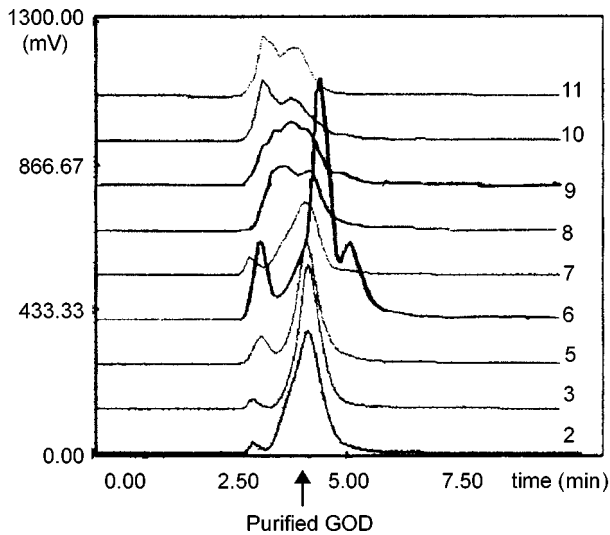


Fig. 8. HPLC chromatograms of various preparations;  $C_{18}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm L, Mobile phase with 90% water and 10% acetonitrile and 0.5 mL/min flow rate.

향을 주는 요인에 초점을 맞추지 않았다. Fig. 7에 나타난 두 가지 유형의 띠는 Ye와 Combes의 보고에 근거한다면 81,000 정도는 dimer 형태로 볼 수 있으며 70,000 정도는 dimer에서 단위 FAD가 일부 떨어진 변성된 GOD라고 추정할 수 있다. 그러나 그 변성된 GOD 역시 활성을 가지고 있지만 dimer 형태보다는 낮다는 것을 알았다(Table 3). 따라서, ammonium sulfate fractionation과 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.0으로 dialysis 단계를 거치게 되면 활성이 낮은 변성된 GOD를 얻게 되므로 단순히 조효소액을 원심분리만으로 불순물을 어느 정도 제거한 후 anion exchange chromatography를 거쳤을 때 dimer 형태의 활성이 높은 GOD를 얻을 수 있게 된다.

Table 1에 근거하여 정제된 Sample에 대한 GOD의 순도를 확인하기 위하여 GOD의 구성성분 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide)의 용출에 사용되었던 이동상과 고정상의 조건(Fig. 1)을 참고하여 90% water와 10% 아세토나이트릴로 이루어진 이동상으로 용리시켰는데 Fig. 8에서 볼 수 있듯이 체류시간 3-4분 사이의 GOD peak를 제외한 다른 peak는 거의 보이지 않았다. 그 수율이 95% 이상으로 높게 얻을 수 있었다. 대부분의 크로마토그램에서 볼 수 있듯이 약 3분대의 peak와 약 4분대

의 peak로 크게 구분할 수 있는데 먼저 용출된 peak는 변성된 GOD이고 나중에 나타난 peak가 dimer의 GOD임을 확인할 수 있었다. 그런데 Sample No. 6의 경우에는 약 5분 경에 또 다른 peak가 나타났는데 같은 조건으로 수행된 정제 단계(Sample No. 7-9)와 다른 특성을 보이고 있다. 본 연구에서는 dimer와 변성된 또 다른 GOD를 각각 분리하는데 목적이 있는 것이 아니라 고농도/고역가의 GOD만의 분리 정제에 그 목적을 가졌기 때문에 두 가지 형태의 GOD 분리 실험은 수행하지 않았다.

## 참고문헌

1. Pazur, J. H. and Kleppe, K.: *Biochemistry*, **3**, 578(1964).
2. Hong, S. H., Kim, T. J., Jung, Y. S., Kim, S. U. and Yun, J. W.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(4), 468(1995).
3. Sung, W. J. and Bae, Y. H.: *Analytical Chemistry*, **72**(9), 2177(2000).
4. Kushi, R. T., Monti, R. and Contiero, J.: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **25**(2), 63(2000).
5. Garzillo, A. M. V., Dipaolo, S., Fenice, M., Petruccioli, M., Buonocore, V. and Federici, F.: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **22**, 169(1995).
6. Swoboda, B. E. P. and Massey, V.: *Biological Chemistry*, **240**, 2209 (1965).
7. Chakraborty, S., Schopfer, L. M. and Massey, V.: *J. Biol. Chem.*, **265**(7), 3793(1990).
8. Enshasy, H. E., Hellmuth, K. and Rinas, U.: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **81**, 273(1998).
9. Moon, I. S., Park, S. K. and Lee, K. Y.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**(4), 409(1993).
10. Bradford, M. M.: *Analytical Biochemistry*, **72**, 248(1976).
11. The MERK INDEX 11<sup>th</sup> ed., p4354.
12. Ye, W. N., Combes, D. and Monsan, P.: *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 498(1988).
13. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. and Jones, K. M.: "Data for Biochemical Research," 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University(1968).
14. Elving, Markowitz and Rosenthal: *Analyt. Chem.*, **28**, 1179(1956).
15. Han, S. B., Kim, K. J., Lim, H. J., Kim, T. N. and Choi, D. S.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**(1), 55(1994).
16. Ye, W. N. and Combes, D.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **999**, 86(1989).